geons: 3. Epizootiological considerations / D.J. Alexander, G.W. Wilson, J.A. Thain, S.A. Lister // Vet. Rec. 1984 c. Vol. 115. P. 213-216.
9. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis / B.S. Seal, D.J. King, J.D. Bennett [et al.] // J. Clin. Microbiol. 1995. Vol. 33. P. 2624-2630.
10. Characterization of Newcastle disease viruses isolated in Italy in 2000 / G. Cattoli, R.J. Manvell, E. Tisato [et al.] // Avian Pathol. 2001. Vol. 30. P. 465-469.
11. Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the peoples Republic of China and Taiwan / L. Yu, Z.L. Wang, L. Chang [et al.] // J. Clin. Microbiol. 2001. Vol. 39. P. 3512-3519.
12. Collins, M.S. Pathogenicity and phylogenetic evaluation of the variant Newcastle disease viruses termed pigeon PMV-1 viruses based on the nucleotide sequences of the fusion protein gene / M.S. Collins, I. Strong, D.J. Alexander // Arch. Virol. 1996. Vol. 141. P. 635-647.
13. Identification grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region from the F gene / A. Ballagi-Pordany, E. Wehmann, J. Herczeg [et al.] // Arch. Virol. 1996. Vol. 141. P. 243-261.
14. Kaleta, E.F. The first isolation of the avian PMV-1 virus responsible for the current panzootic in pigeons? / E.F. Kaleta, D.J Alexander, P.H. Russell // Avian Pathol. 1985. Vol. 14. P. 553-557.
15. Lamb, R.A. Paramyxoviridae: the viruses and their replication / R. A. Lamb, D. Kolakofsky // Fundamental Virology Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 2002. P. 1305-1340.
16. Mayo, M. A. Virus Taxonomy-Houston 2002 / M.A. Mayo // Arch. Virol. 2002. Vol. 147. P. 1071-1076.
17. Molecular epidemiological analysis of Newcastle disease virus isolated in China in 2005 / H. Liu, Z. Wang, Y. Wu [et al.] // J. Virol. Meth. 2006. Vol.140. P. 206-211.
18. Newcastle disease // O.I.E. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 2005. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00038.htm.
19. Newcastle disease virus evolution. 2. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent stains / T. Toyoda, T. Sakaguchi, H. Hirota [et al.] // Virology. 1989. Vol. 169. P. 273-282.
20. Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks in Taiwan phylogenetically related to viruses (Genotype VII) from recent outbreaks in Western Europe / C.Y. Yang, H. K. Shieh, Y.L. Lin [et al.] // Avian Dis. 1999. Vol. 43. P. 125-130.
21. Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and novel genotype (VII) / B. Lomniczi, E. Wehmann, J. Herczeg [et al.] // Arch. Virol. 1998. Vol. 143. P. 49-64.
22. Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeons (Columba livia) and suggests multiple species transmission / D. Ujvari, E. Wehmann, E. F. Kaleta [et al.] // Virus Research. 2003. Vol. 96. P. 63-73.
23. Seal, B.S. Analysis of matrix protein gene nucleotide sequence diversity among Newcastle disease virus isolates demonstrates that recent disease outbreaks are caused by viruses of psittacine origin / B.S. Seal // Virus Genes. 1996. Vol. 11. P. 217-224.
24. Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus / T. Toyoda, T. Sakaguchi, K. Imal [et al.] // Virology. 1987. Vol. 158. P. 242-247.
25. Two novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in Southern Africa, one (VIIb) of which reached Southern Europe // J. Herczeg, E. Wehmann, R.R. Bragg [et al.] // Arch. Virol. 1999. Vol. 144. P. 2087-2099.

УДК 619:578.825.1:636.592:57.082.26

А.А. Пяткина, Ш.К. Куляшбекова

«МНОГОСЛОЙНЫЙ» МЕТОД КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСА ГЕРПЕСА ИНДЕЕК

Введение

Технология изготовления вакцин против болезни Марека (БМ) [2, 5, 8] основана на культивировании вируса в клеточном монослое. С этой целью используют первично трипсинизированную культуру клеток куриных фибробластов (КФ) СПФ-эмбрионов кур [1, 3, 6], которую выращивают на плоскостенных матрасах или роллерных сосудах различных емкостей.

В связи с тем, что вирус болезни Марека является клеточно-ассоциированным, основная задача технологов состоит в получении наибольшего количества вируссодержащих клеток. При этом важно подчеркнуть, что распространение возбудителя в живых тканях в основном происходит путем перемещения его через мембраны контактирующих клеток [1, 4, 7].

Целью настоящей работы являлось исследование возможности культивирования вируса в клеточном полислое («многослойный» метод), что в результате может существенно повысить эффективность технологии изготовления вакцины.

Материалы и методы

Вирусный материал. В работе использовали штамм «Владимир» вируса герпеса индеек (ВГИ) с инфекционной активностью $1{,}2 \times 10^6$ ФОЕ/см^3.

Культура клеток. Для культивирования вируса и определения его инфекционной активности использовали первично трипсинизированную культуру клеток КФ, которую получали из 11-дневных эмбрионов СПФ-кур (фирма «Hy-Vac», США). Трип-

синизацию эмбрионов проводили соответственно установленному промышленному регламенту. Посевная концентрация клеток составляла в среднем 1,6x10^6 кл/см^3. Культуру клеток КФ выращивали в течение 24-72 часов при температуре 38,5±1° С.

Сосуды и аппараты. Культивирование первичных клеток КФ и вируса проводили на внутренней поверхности роллерных бутылей емкостью 3 дм^3 (сосуды помещали на вращательный аппарат со скоростью вращения 8-12 об/мин) и во флаконах емкостью 50 см^3 фирмы «Costar». Выращивание монослоя во флаконах проводили в стационарных условиях.

Питательные среды и растворы. В экспериментах использовали следующие питательные растворы: среда Марека (смесь равных частей среды 199, среды Игла и гидролизата лактальбумина на солевом растворе Хенкса); 0,25% раствор трипсина и солевой раствор Хенкса. В ростовую среду Марека добавляли 10% сыворотки крупного рогатого скота, а в поддерживающую среду – 2-5%. Величина pH ростовой и поддерживающей сред составляла 6,9-7,2.

Культивирование вируса. Культивирование вируса проводили на монослое клеток КФ в течение 48-72 часов при 38,5±1° С. Множественность заражения составляла около 4x10^3 ФОЕ/см^3. Состояние инфицированного монослоя клеток и цитопатическое действие (ЦПД) вируса наблюдали под оптическим микроскопом. При распространении ЦПД на 70% площади монослоя вируссодержащие клетки подвергали дезагрегации раствором трипсина, суспендировали, фильтровали и освобождали от трипсинсодержащей среды центрифугированием. Далее клетки ресуспендировали в питательной среде с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота

Определение концентрации жизнеспособных клеток. Клетки подсчитывали в камере Горяева, для чего 1,0 см^3 тщательно перемешанной суспензии вакцины разводили питательной средой или физиологическим раствором в 10 раз и к 1,0 см^3 клеточной взвеси добавляли равный объем 0,2%-го раствора трипановой сини. Подсчитывали только клетки, имеющие ядро и неповрежденную цитоплазму. Процент жизнеспособных клеток определяли по формуле:

$$P_{ж.кл.} = [N_{об.кл.} - N_{м.кл.}]/N_{об.кл} \times 100\ (\%),$$

где: $P_{ж.кл}$ – процент жизнеспособных клеток; $N_{об.кл.}$ – общее число клеток; $N_{м.кл.}$ – число мертвых клеток.

Определение инфекционной активности вируса. Инфекционную активность вируса оценивали количеством фокусообразующих единиц (ФОЕ) на монослое клеток КФ по Каверину Н.В. (1961) во флаконах. Использовали метод последовательных разведений. Величину титра вируса определяли по формуле:

$$T = \{[(K_1+K_2+\ldots+K_n)/n]x10^a\}/V,$$

где: T – титр вируса, выраженный в ФОЕ/см^3; K_1, K_2,…, K_n – количество бляшек во флаконе; n – количество флаконов для подсчета; V – объем суспензии вируса, внесенный во флакон, см^3; a – показатель степени разведения вируса.

Статистическая обработка результатов. Вычисляли средние величины инфекционных титров вируса (X) и средние оценки контраста значений титров в опыте (x_1) и контроле (x_2) при параллельном сравнении ($\Delta=x_1-x_0$), а также их стандартные отклонения (m_x и m_Δ). Существенность оценки Δ определяли проверкой выполнимости неравенства, имеющего вид:

$$(\Delta/m_\Delta) \geq t_p,$$

где t_p – табличное значение коэффициента Стьюдента, для избранного уровня значимости (p) и данного числа степеней свободы (v=n-1).

Результаты и обсуждение

Для данных исследований использовали роллерные сосуды с полным монослоем клеток КФ. Однослойную культуру клеток КФ нарабатывали согласно общепринятых методик получения первичных клеточных культур, утвержденных в ФГУ «ВНИИЗЖ».

Для опыта были сформированы 3 группы (по 9 штук) роллерных сосудов с монослоем КФ. Две группы, I и II, являлись опытными, и третья была контрольной (К). При замене ростовой среды в группах I и II в состав поддерживающей среды включали вирус (в концентрации 4x10^3 ФОЕ/см^3) и суспензию первично-трипсинизированных клеток в концентрациях 0,6±0,1 и 1,2±0,1 млн кл/см^3 для групп I и II соответственно. В контрольной группе в состав поддерживающей среды включали только вирус в указанной концентрации. Ежедневно проводили осмотр сосудов под микроскопом и оценивали качество монослоя. Уже через 24 часа произошло максимальное прикрепление дополнительно внесенных клеток КФ (формирование полислоя), при этом число неприкрепившихся клеток было минимальным.

Через 48 часов после заражения во всех группах наблюдали цитопатическое действие вируса, распространенное не менее чем

Таблица 1

Условия культивирования вируса герпеса индеек и соответствующие оценки конечной концентрации вируссодержащих клеток

Условия культивирования вируса		Конечная концентрация клеток (млн/см³)
Группы	Количество дополнительно внесенных клеток при заражении (млн кл/см³)	
I	0,6±0,1	13,6
II	1,2 ±0,1	17,1
К	Не вносили	9,8

Таблица 2

Результаты определения инфекционной активности вируссодержащих клеточных суспензий и их статистический анализ

Номера параллельных пар флаконов	Инфекционный титр вируса (Хх10⁶ ФОЕ/см³)			Оценка контраста	
	Группа I (X_1)	Группа II (X_2)	Группа К (X_0)	$\Delta=X_1-X_0$	$\Delta=X_2-X_0$
1	1,68	2,48	2,20	-0,52	0,28
2	2,28	2,44	1,30	0,98	1,14
3	1,82	3,08	1,50	0,32	1,58
4	2,04	3,14	1,38	0,66	1,76
5	2,00	2,94	1,20	0,80	1,74
6	1,72	3,36	1,30	0,42	2,06
7	2,30	2,60	1,50	0,80	1,10
8	2,44	3,18	1,56	0,88	1,62
9	1,86	2,68	1,40	0,46	1,28
10	2,12	2,18	1,72	0,40	0,46
Среднее значение	2,026±0,082	2,808±0,122	1,506±0,09	0,52±0,136	1,302±0,182

на 70% площади монослоя. Инфицированные вирусом клетки, соответственно образованных групп, после дезагрегации с роллеров были ресуспендированы в 100 см³ питательной среды с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота. В опытных и контрольной группах определяли концентрацию жизнеспособных клеток. Полученные данные, соответственно образованным группам, представлены в табл. 1.

Данные табл. 1 показывают, что соответственно количеству дополнительно внесенных клеток при заражении, происходило возрастание концентрации жизнеспособных клеток, полученных при сборе вируссодержащей клеточной суспензии. Установили, что при дополнительном внесении 0,6±0,1 млн кл/см³ в группе I концентрация возрастала до 13,6 млн кл/см³, а при внесении 1,2 ±0,1 млн кл/см³ в группе II концентрация составила 17,1 млн кл/см³.

Для всех испытуемых групп процент живых клеток был не ниже 92,0±2,0%. При окрашивании клетки имели четкие контуры с ярко выраженными границами.

Таким образом, при использовании предлагаемого метода культивирования вируса была подтверждена возможность получения более концентрированной вируссодержащей суспензии с наименьшими материальными затратами, что позволяет снизить себестоимость вакцинной продукции при крупномасштабном производстве.

На втором этапе работы во всех группах определяли инфекционный титр вируса в полученном клеточном вируссодержащем материале. Применяли метод последовательных разведений. Для оценки титра вируса было выбрано наименьшее разведение материала, при котором наблюдаемое число ФОЕ было максимальным, но взаимного перекрывания зон цитопатического эффекта на монослое не происходило. Подсчет ФОЕ проводили в разведении 10^{-4}, с последующим приведением значения титра к объему в 1 см³.

Флаконы с однослойной культурой в опытной и контрольной группах были в равном числе одинаково пронумерованы (параллельные пары). Оценивали средние значения групповых титров и определяли разность титров в парных флаконах по отношению к контролю (контраст). Далее оценивали достоверность средних значений контраста. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Из данных, представленных в табл. 2, следует, что инфекционная активность вируса клеточной суспензии в опытных группах превосходила соответствующие показатели контроля. Средние значения инфекционных титров в группе I (2,026±0,082 x10^6 ФОЕ/см^3) и в группе II (2,808±0,122x10^6 ФОЕ/см^3) были выше контрольного показателя (1,506±0,09x10^6 ФОЕ/см^3).

Средние величины контраста титров по отношению к контролю имели высокую значимость для обеих групп. Соответствующие статистические неравенства имели следующий вид: $t=3,821>t_{p\leq 0,005}=3,69$ (группа I) и: $t=7,162>t_{p\leq 0,001}=4,78$ (группа II). Полученные данные позволяют считать, что в опытных группах во время заражения происходило инфицирование как сформировавшегося монослоя клеток, так и дополнительно внесенных клеток КФ, которые в последующем образовали полислой.

По результатам проведенных исследований установлено, что предлагаемый метод культивирования вируса болезни Марека оказался более совершенным по сравнению с используемой технологией в настоящее время. Это преимущество позволит существенно снизить затраты технологического процесса и повысить интенсивность производства вакцины против болезни Марека.

Выводы

1. При использовании «многослойного» метода культивирования конечная концентрация вируссодержащих клеток увеличилась по отношению к контролю (9,8x10^6 кл/см^3) до 13,6 и 17,1 млн кл/см^3, соответственно.

2. Инфекционная активность вируса, полученного модифицированным методом, возросла по отношению к контрольному показателю (1,506±0,09x10^6 ФОЕ/см^3) до 2,026±0,082 (группа I) и 2,808±0,122x10^6 (группа II) ФОЕ/см^3.

3. Предлагаемый способ «многослойного» культивирования клеток и вируса может быть использован для повышения эффективности производства при изготовлении моновалентной вакцины из штамма «Владимир» ВГИ.

РЕЗЮМЕ

В данной работе изучали возможность получения наибольшего количества вируссодержащих клеток инфицированных вирусом герпеса индеек штамма «Владимир», используя метод «многослойного» культивирования на роллерных сосудах. Установили, что, при заражении монослоя клеток куриных фибробластов (КФ), в результате внесения в инфицирующую поддерживающую среду свежетрипсинизированных клеток в концентрациях 0,6 (группа I) и 1,2 млн кл/см^3 (группа II), конечная концентрация вируссодержащих клеток увеличилась по отношению к контролю (9,8 млн кл/см^3) до 13,6 и 17,1 млн кл/см3, соответственно. При этом инфекционная активность вируса возросла по отношению к контрольному показателю (1,506±0,09x10^6 ФОЕ/см^3) до 2,026±0,082 (группа I) и 2,808±0,122x10^6 (группа II) ФОЕ/см^3. Таким образом, предлагаемый метод «многослойного» культивирования позволяет усовершенствовать технологию изготовления жидких вирусвакцин против болезни Марека.

SUMMARY

In this paper the possibility of obtaining the maximum number of virus-containing cells infected by the turkey herpes virus of strain «Vladimir» was studied using the method of «multilayer» cultivation in roller bottles. It was determined that after adding of freshly-trypsinized cells to the infective maintenance medium at the concentration of 0,6 (group I) and 1,2 mln cells/cm^3 (group II), the final concentration of virus-containing cells increased as compared with the control (9,8 mln cells/cm^3) up to 13,6 and 17,1 mln cells/cm^3, respectively. Furthermore, the infectious activity of the virus increased as compared with the control value (1,506±0,09x10^6 FFU/cm^3) up to 2,026±0,082 (group I) and 2,808±0,122x10^6 (group II) FFU/cm^3. Thus, the developed method of «multilayer» cultivation enables to improve the production technology of liquid virus vaccines against Marek's disease.

Литература

1. Вирусные болезни животных. / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина // Вирусные болезни животных. М: ВНИТИБП, 1998. С. 689-721.
2. Жданов, В.М. Вирусология. / В.М. Жданов, С.Я. Гайдамович // Вирусология. М: Медицина, 1966. С. 154, 437.
3. Лукина, В.А. Современное состояние и перспективы вакцинопрофилактики болезни Марека. / В.А.Лукина, Б.В. Соловьев, Н.Н. Быкова // Науч. основы производства вет. биол. препаратов: тез. докл. Щелково, 2000. С. 6-8.
4. Спиера, Р.Е. Биотехнология клеток животных / Р.Е.Спиера , Д.Б. Гриффитс //Биотехнология клеток животных: в 2-х т. М: Во Агропромиздат, 1989. Т.2. С.5-8.
5. Куляшбекова, Ш.К. Меры борьбы с болезнью Марека с помощью вакцинопрофилактики. / Ш.К. Куляшбекова, А.В.Борисов // III Международный ветеринарный конгресс по птицеводству. Москва, 2007. С. 126-131.
6. Biggs, P.M. The history and biology of Marek,s disease virus. / P.M. Biggs // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2001. Vol.225. P. 1-24.
7. Calnek, B.W. Marek,s disease. / B.W. Calnek, R.L.Witter // Diseases of Poultry. Ames, Iowa. 1997. P. 369-413.
8. Payne L.N. Marek,s disease – field experience and vaccination strategies. / L.N. Payne // Poultry Int. 1993. Vol .32, N13. P. 32-35.